

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4559729号  
(P4559729)

(45) 発行日 平成22年10月13日(2010.10.13)

(24) 登録日 平成22年7月30日(2010.7.30)

(51) Int. Cl.	F I
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 C
GO 1 N 21/76 (2006.01)	GO 1 N 33/53 V
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 21/76
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/50 J
	GO 1 N 33/543 5 1 5 D
	請求項の数 10 (全 14 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-517576 (P2003-517576)	(73) 特許権者	501251987
(86) (22) 出願日	平成14年7月30日(2002.7.30)		クエスト ダイアグノスティクス インヴ
(65) 公表番号	特表2004-537728 (P2004-537728A)		エストメンツ インコーポレイテッド
(43) 公表日	平成16年12月16日(2004.12.16)		アメリカ合衆国 デラウェア州 1989
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/024038		9 ウィルミントン デラウェア アヴェ
(87) 国際公開番号	W02003/012433		ニュー 300
(87) 国際公開日	平成15年2月13日(2003.2.13)	(74) 代理人	100082005
審査請求日	平成17年8月1日(2005.8.1)		弁理士 熊倉 禎男
(31) 優先権主張番号	09/918, 297	(74) 代理人	100084009
(32) 優先日	平成13年7月30日(2001.7.30)		弁理士 小川 信夫
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100084663
			弁理士 箱田 篤
		(74) 代理人	100093300
			弁理士 浅井 賢治
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 妊娠検出方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

女性の妊娠検出方法であって、以下の工程、

(1) 女性の生体サンプルを、(i)少なくとも2種のキャプチャー抗体であって、前記抗体の一方が、B152が結合するエピトープと同じITAのエピトープと特異的に結合し、かつ、他方が、クローン820又はクローン827が結合するエピトープと同じhCGのエピトープに特異的に結合するキャプチャー抗体、及び(ii)前記キャプチャー抗体が結合するエピトープと異なるITA及びhCGのエピトープに結合する単一検出抗体に接触させる工程であって、前記検出抗体が、B207が結合するエピトープと同じエピトープに結合することができ、1回のアッセイにおいて、検出シグナルを生成するのに有効な標識に連結されている工程、及び

10

(2) hCG及びITAを表す標識によって生成されるシグナルを検出する工程であって、前記検出シグナルの存在が、女性の妊娠を示す工程、を含むことを特徴とする方法。

【請求項 2】

前記少なくとも2種のキャプチャー抗体が、B152及びクローン827と命名されている請求項1記載の方法。

【請求項 3】

前記少なくとも2種のキャプチャー抗体が、B152及びクローン820と命名されている請求項1記載の方法。

20

## 【請求項 4】

前記検出抗体が、B207と命名されている請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 5】

前記アッセイが、化学ルミネッセンスアッセイである請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 6】

前記生体サンプルが、尿サンプルである請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 7】

前記標識が、アクリジニウムエステルである請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 8】

前記生体サンプルが、排卵後、7日以内に得たものである請求項 1 記載の方法。

10

## 【請求項 9】

前記生体サンプルが、in vitro受精の後4日以内に得たものである請求項 1 記載の方法

## 【請求項 10】

前記アッセイが、自動化されている請求項 1 記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は女性の妊娠検出のための方法を提供する。特に、本発明の方法は妊娠に関連する生体マーカーに対し生体サンプルをスクリーニングすることを含む。本発明の1つの特徴は1回のアッセイにおいて、ITAの異なるエピトープと特異的に結合する2種のキャプチャー抗体を組み合わせる使用することにより、前記生体マーカーに対する前記アッセイの感度が向上するという発見と関係があることである。

20

本発明の1つの態様において、女性の妊娠検出の方法は以下の工程を包含する。即ち、化学ルミネッセンスアッセイにおいて、前記女性の生体サンプルを、侵入性トロホプラスト抗原(ITA)と結合する抗体と接触させる工程を含み、前記アッセイはITAの異なるエピトープと特異的に結合する少なくとも2種の抗体を含み、前記2種の抗体の少なくとも1つに連結されている標識は検出可能なシグナルを生成し、検出可能なシグナルの存在が女性の妊娠を示す。

本発明の別の態様において、女性の妊娠検出の方法は、前記女性の生体サンプルを、1回のアッセイにおいて、ITAに結合する抗体と接触させる工程を含む。前記アッセイはITAの異なるエピトープと特異的に結合する少なくとも2種の抗体を含み、前記2種の抗体の少なくとも1つと連結されている標識が検出可能なシグナルを生成する。

30

## 【0002】

本発明の別の態様において、女性の妊娠検出方法は、前記女性の生体サンプルを、1回のアッセイにおいて、少なくとも1種の妊娠マーカーと結合する抗体と接触させる工程を含む。前記アッセイは前記マーカーの異なるエピトープと特異的に結合する少なくとも2種のキャプチャー抗体と、そのキャプチャー抗体と結合するエピトープと異なる前記マーカーのエピトープと特異的に結合する少なくとも1種の検出抗体とを含む。そして、前記検出抗体と結合する標識が検出可能なシグナルを生成する。特定の態様において、妊娠マーカーはITA又はヒトコリオン性腺刺激ホルモン(hCG)又はそれらのフラグメントを含む。本発明の他の態様において、前記妊娠マーカーはITA及びhCGの組み合わせ、又はそのフラグメントを含む。

40

本発明の別の態様において、女性の妊娠検出方法は、前記女性の生体サンプルを1回のアッセイにおいてITAと結合する抗体と接触させる工程を含む。前記アッセイはITAの異なるエピトープと特異的に結合する少なくとも2種のキャプチャー抗体と、前記キャプチャー抗体と結合するエピトープと異なるITAのエピトープと結合する少なくとも1つの検出抗体とを含む。そして、前記検出抗体に連結されている標識は検出シグナルを生成する。

上記方法は前記生体サンプルを、hCGのような追加のマーカーの少なくとも1つと結合する抗体又はその抗体のフラグメントと接触させることにより実施することもできる。

50

## 【 0 0 0 3 】

本発明のさらにもう一つの態様において、女性の妊娠検出方法は、1回のアッセイにおいて、前記女性の生体サンプルを、ITAとhCGと結合する抗体と接触させる工程を含む。前記アッセイはITA及びhCGの異なるエピトープと特異的に結合する少なくとも2種のキャプチャー抗体と、前記キャプチャー抗体と結合するエピトープと異なるITA及びhCGのエピトープと結合する少なくとも1つの検出抗体とを含む。そして、前記検出抗体と結合する標識は検出可能なシグナルを生成する。

本発明の特定の態様において、前述の方法の前記キャプチャー抗体及び検出抗体はモノクロナール抗体である。キャプチャー抗体の具体例としては、B152、クローン827及びクローン820と命名されたモノクロナール抗体が含まれる。検出抗体の具体例としては、B207と命名されたモノクロナール抗体が含まれる。

本発明の別の態様において、女性の妊娠検出方法は、a)前記女性の生体サンプルをB152と命名されたキャプチャー抗体と接触する工程と、b)前記生体サンプルをB207と命名された検出抗体と接触させる工程とを含む。この場合、前記キャプチャー抗体と検出抗体とは異なるITAのエピトープを認識し、結合する。そして前記検出抗体は検出可能な化学ルミネッセンスシグナルを生成する標識と連結されている。

## 【 0 0 0 4 】

本発明のさらにもう一つの態様において、女性の妊娠検出方法は、前記女性の生体サンプルを、1回のアッセイにおいて、ITA及びhCGと結合する抗体と接触させる工程を含む。この場合、前記アッセイはITA及びhCGの異なるエピトープと特異的に結合するB152及びクローン827と命名された少なくとも2種のキャプチャー抗体と、前記キャプチャー抗体と結合したエピトープと異なるITA及びhCGのエピトープに結合するB207と命名された少なくとも1つの検出抗体とを含む。そして、前記検出抗体は検出可能なシグナルを生成する標識と連結されている。

本発明の方法において使用される生体サンプルは、液体又は組織サンプルを含む。液体サンプルは尿、全血、血清、血漿、又は羊水を含む。組織サンプルは臍組織、又は胎盤組織を含む。

本発明のいくつかの態様において、前記検出可能なシグナルは、アクリジニウムエステルのルミネッセンスを測定することにより得られる。

前述の方法は排卵後又はin vitro受精後約7日以内に実施できる。いくつかの態様において、前記方法は排卵の約5日以内、又はin vitro受精の約4日以内に実施できる。

前述の方法の前記アッセイは自動化してもよい。

ここに記述されているいかなる特徴又は特徴の組み合わせも、本発明の範囲内に包含される。但し、そのようないかなる組み合わせに含まれる特徴は、文脈、本明細書及び当業者の知識から明らかかなように、相互に矛盾しない。

本発明の更なる利益及び特徴は、以下の詳細な説明及び請求の範囲において明白である。

## 【 発明の開示 】

## 【 発明が解決しようとする課題 】

## 【 0 0 0 5 】

別の定義をされていない限り、ここで用いられているすべての技術的及び科学的な用語は本発明が属する当業者により共通に理解されていると同一の意味をもつ。本発明の目的上、以下の用語は以下に定義する。

ここで用いられる“侵入性トロホプラスト抗原”(ITA)は、妊婦の胎盤のトロホプラスト細胞から分泌された糖タンパクホルモンである。ITAはまた過剰グリコシル化された(hyperglycosylated)hCGといわれる。ITAはC5hCGに似ており、絨毛癌患者から得られるニックh-hCGである。ITAは定義されているようにITAのフラグメント又はITAの変異体を含む。特にITAはITAと類似した生体活性又は発現形式を示す分子及びニックhCG、hCGのサブユニット、hCGのサブユニット、又はそれらのいかなる組み合わせを含めて、通常のグリコシル化されたhCGと比較して異常な炭水化物濃度を示す分子を含む。

ITAのイソ型の例は57%三触角(triantennary)N連鎖オリゴ糖及び68%六糖類O連鎖オリゴ糖を含む。別のITAイソ型は48%三触角(triantennary)N連鎖オリゴ糖及び100%六糖類O連鎖オリゴ糖である。正常の妊娠において、より複雑な三触角(triantennary)N連鎖オリゴ糖(0-30%)の割合は相対的に小さいこと、及びより大きい六糖類O連鎖糖単位(0-20%)の割合が分かった。

#### 【0006】

ここで用いられる、“妊娠マーカー”は、妊娠に関連している発現形式又は生体活性を有する分子と定義する。前記妊娠マーカーはITA、hCG、及びそのフラグメントを含む。妊娠マーカーの他の例としては、サブユニットhCG、コアhCG、非共役のエストリオール(UE3)、 $\alpha$ -フェトプロテイン(AFP)、レプチン、プロレニン、レニン、DHEA-S、白血球酸フォスファターゼ、インヒピン、妊娠関連血漿タンパクA(PAPP-A)、AFP-L3、P43、スーパーオキシジスムターゼ(SOD)、proMBP、胎児のDNA、インシュリン様成長因子結合タンパク3(IGFBP3)、CA125、胎盤ラクトゲン、Hp2FF、血清シアリルトランスフェラーゼ、s100bタンパク、シュワンガーズシャフツ(schwangerschafts)タンパク1(SP1)、アクチビンA/フォリスタチン、胎児抗原(FA-2)、胎盤アルカリホスファターゼ(PALP)が挙げられるがこれに限定されるものではない。

本発明の1つの態様において、ITAはITAのフラグメントを含む。例えば、hCG調製物と比較してより大きいニックがITA調製物において観察される。例えば、ITAはそのサブユニット上の類似の部位にてニックされ、又は切断され、また会合してフリーのサブユニット及びニックされたフリーの過剰グリコシル化(hyperglycosylated)されたサブユニットを形成してもよい。ITAのニックされたフリーサブユニットは、痕跡量の過剰グリコシル化(hyperglycosylated)糖部分とともにジスルフィド結合ペプチドを含むサブユニットのコアフラグメントにさらに分解することもできる。

#### 【0007】

ここで用いられる“抗体”は、免疫グロブリン遺伝子又はそれらのフラグメントにより実質的にコードされたポリペプチドであり、抗原を特異的に認識し、それと結合する。前記認識された免疫グロブリン遺伝子は前記免疫グロブリンの可変領域遺伝子とともに、 $\kappa$ 、 $\lambda$ 、 $\mu$ 、及び $\delta$ の定常領域遺伝子を含む。抗体はFab'、F(ab)<sub>2</sub>、Fabc、及びFvフラグメントなどのフラグメントを含む。ここで用いられる“抗体”という語はまた、全抗体の変異によって産生されたものでも、DNA組換え手法を用いたデノボ合成された抗体フラグメントでもよく、さらに現在の常用されている技術により作られた“ヒト化”(humanized)抗体も含む。

前記抗体がタンパクとの結合反応において機能する場合、抗体はタンパクと、“特異的に結合する”又は、“免疫反応する”。抗体が、タンパクと結合するためには、前記タンパクは前記抗体と接触する。従って、注目している抗原を含んでいることが疑われるサンプルを抗体に接触させることによって前記抗体は前記抗原と特異的に結合することができる。前記抗体が前記タンパクと結合すると、タンパク及び他の物質の不均一な集団の存在下、サンプル中の前記タンパクの存在が決定できる。かくして、所定の免疫測定条件下、特定の抗体が選択的に特定のタンパクに結合し、前記サンプル中の存在する他のタンパクとは有意に結合しない。そのような条件下でタンパクと特異的に結合するためには、特定のタンパクに特異性を有するものとして選ばれた抗体が必要である。ペプチドが抗体に免疫反応性であるか否かを決定するいくつかの方法は当該技術分野において公知である。

#### 【0008】

ここで用いられている“キャプチャー抗体”は固体基質のような基質に付着する抗体、好ましくはモノクローナル抗体である。前記キャプチャー抗体はITAやhCGのような抗原の特定かつ独特のエピトープと特異的に結合するように選択されたものである。

ここに開示されているように、1つのキャプチャー抗体はB152と命名されており、磁性粒子を含む固体基質に付着してもよい。モノクローナル抗体B152は特異的にITAと結合する。前記モノクローナル抗体B152を産生するハイブリドーマは1998年2月3日に、特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブタペスト条約の規約の下、米国メリーラ

10

20

30

40

50

ンド20852ロックビル、パークロンドライブ12301の米国種培養コレクション(ATCC)に、寄託された。前記ハイブリドーマには、ATCC受託番号HB-12467が付与された。前記B152抗体は、以下に開示されているようにC5hCGに対して産生したものである。WO98/10282, Prenatal Screening for Down's Syndrome Using Hyperglycosylated Gonadotropin; Cole et al., (1998) Hyperglycosylated hCG, a Potential Alternative to hCG in Down Syndrome Screening, Prenatal Diagnosis, 18:926-933; Cole et al., (1999) Hyperglycosylated Human Chorionic Gonadotropin (Invasive Trophoblast Antigen) Immunoassay: A New Basis for Gestational Down Syndrome Screening, 45:2109-2119。前記B152モノクロナール抗体を産生するハイブリドーマはコロンビア大学より得た。

#### 【0009】

本発明の方法を実施するために用いた別のキャプチャー抗体は、メイン州ソーコのバイオデザインインターナショナルから市場において入手可能な(カタログ番号E45550M)、モノクロナール抗体であるクローン820である。クローン820はhCGに対するモノクロナール抗体である。クローン820は無処置のhCG(交叉反応性が100%である)と特異的に結合する。前記交叉反応性はhCGについて1.0%未満、-hCGについて1.0%未満、黄体形成ホルモンについて0.1%未満、甲状腺刺激ホルモンについて0.1%未満、及び小胞刺激ホルモンについて0.1%未満である。しかし、以下に実施例2で記載のように、クローン820はITAとも特異的に結合しうる。前記ITA標準は前記クローン820と反応したためである。クローン820はマウスで生成され、IgG1アイソタイプである。前記ハイブリドーマはミエローマ細胞を、Balb/cマウスからの脾臓細胞と融合することにより調製される。精製されたクローン820はpH7.2、0.15M食塩水、0.015Mのリン酸カリウム塩バッファーに、濃度5.64mg/mLで、液体型に貯蔵される。防腐剤は0.1%アジ化ナトリウムである。

#### 【0010】

本発明の方法を実施するために用いた別のキャプチャー抗体はメイン州ソーコのバイオデザインインターナショナルから市場において入手可能な(カタログ番号E45575M)、モノクロナール抗体クローン827である。クローン827はhCGのサブユニットに対するモノクロナール抗体である。クローン827は-hCG(交叉反応性が100%である)と特異的に結合する。前記交叉反応性は無処置のhCGについて0.5%、-hCGについて0.1%未満、黄体形成ホルモンについて0.1%未満、甲状腺刺激ホルモンについて0.1%未満、及び小胞刺激ホルモンについて0.1%未満である。しかし、以下に実施例3で記載のように、クローン827はITAとも特異的に結合しうる。前記ITA標準は前記クローン827と反応したためである。クローン827はマウスで生成され、IgG1アイソタイプである。前記ハイブリドーマはミエローマ細胞をBalb/cマウスからの、脾臓細胞と融合することにより調製される。精製されたクローン827はpH7.2、0.15M食塩水、0.015Mのリン酸カリウム塩バッファーに、濃度4.44mg/mLで、液体型に貯蔵される。防腐剤は0.1%アジ化ナトリウムである。

#### 【0011】

ここで用いられている“検出抗体”は、キャプチャー抗体の結合部位又はエピトープと異なる結合部位又はエピトープにおいて抗原と結合する抗体、好ましくはモノクロナール抗体と、定義される。この技術分野において理解されているように、関連のある抗原に所望される交叉反応性の大きさに依存して、検出抗体の特異性は変わりうる。例えば、そしてここで議論されるように、2種以上の抗原がアッセイされるコンビネーションアッセイにおいて、各々の抗原に特異的に結合する2種のキャプチャー抗体と、両方の抗原分子上の類似又は同一のエピトープと結合する1種の検出抗体とを用いることが望ましいであろう。

本発明の特定の態様において、検出抗体はhCGのサブユニット又はITAのサブユニットを認識するモノクロナール抗体である。1例はB207と命名されたモノクロナール抗体である。モノクロナール抗体B207はhCGのサブユニットに対して生じているが、ITAのサブユニットと交叉反応する。前記B207モノクロナール抗体を産生するハイブリドーマは特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブタペスト条約の規約の下、米国メリーランド20852ロックビル、パークロンドライブ12301の米国種培養コレクション

10

20

30

40

50

(ATCC)に、寄託された。前記ハイブリドーマはATCC受託番号PTA1626が付与された。B207m Abはクリケスキー(Krichevsky)ら(1994)の文献によりて開発され、記述されている。The Development of a Panel of Monoclonal Antibodies to Human Luteinizing Hormone and its Application to Immunological Mapping and Two-Site Assays, *Endocrine*, 2:511-520; WO99/41584, Methods for Predicting Pregnancy Outcome in a Subject by hCG Assay; and WO00/70094, Methods for Predicting Pregnancy Outcome in a Subject by hCG Assay; O'Connor et al., (1998) Differential Urinary Gonadotrophin Profiles in Early Pregnancy and Early Pregnancy Loss, *Prenatal Diagnosis*, 18:1232-1240。B207mAb用のハイブリドーマはコロンビア大学より得た。

#### 【 0 0 1 2 】

ここで記載されているように検出抗体は標識と連結されている。本発明の方法を実施する際用いられる検出抗体の濃度はあらかじめ決めてあり、検出シグナルを生成するに必要な検出抗体の量を決定する実験を行うことにより最適化される。テスト抗原分子の全て又は実質的に全てと検出抗体が結合することを確実にするに十分な濃度の前記検出抗体を提供することは当業者に理解されうる。言い換えると、本発明の装置のシグナル対ノイズ比率を改良するために、前記アッセイ中で検出抗体の非特異的な結合を増加させずに、可能な限り多くの検出抗体を用いるのが好ましい。

本発明の特定の態様において、キャプチャー抗体は抗原の2種の異なるエピトープと特異的に結合するモノクロナール抗体である。例えば、前記2種のキャプチャー抗体はITAのサブユニット上のエピトープと、ITAのサブユニット上のエピトープとに結合してもよい。これとは別に、前記2種のキャプチャー抗体はhCGのサブユニット上のエピトープとサブユニット上のエピトープとに結合してもよい。ITAについてキャプチャー抗体の具体例としては、ここで記載されているようにモノクロナール抗体B152、クローン820、及びクローン827が挙げられている。他の抗原については、他の抗体を従来の免疫学的な技術を用いて生成し、スクリーニングしてもよい。加えて、前記検出抗体は、前記キャプチャー抗体と前記抗原との結合を妨げないエピトープにおいてその抗原と結合するモノクロナール抗体であってもよい。前記検出抗体は相対的に前記キャプチャー抗体より特異性が低くてもよい。例えば、前記検出抗体は第一の抗原と抗原性において類似する別の抗原と交叉反応できる。1例としてはhCGのサブユニット上のエピトープとITAのサブユニット上のエピトープと結合する検出抗体が挙げられる。本発明の1態様においては、前記検出抗体はここで記載されているようにB207と命名されている。

#### 【 0 0 1 3 】

“標識”は分光、光化学、生化学、免疫化学、又は化学的手段により検出可能な組成物である。言い換えると、標識は本発明の方法を実施する際に、検出可能なシグナルを生成する。例えば、有用な標識には蛍光塗料や、化学ルミネッセンス化合物、放射性同位体、電子密度試薬、酵素、着色粒子、ビオチン、ジオキシゲニンが含まれる。標識はしばしば放射能や、蛍光性の光、色素、酵素活性のような測定可能なシグナルを生成する。これにより結合された標識の量を定量することができる。

化学ルミネッセンス化合物の例には、ルシフェリンや、ルミノール誘導体、ピロガロール、イソルミノール、エクオリン、環状アリルヒドラジド、ジオキセタン、ロジウムキレート(電子的化学ルミネッセンス)、シュウ酸エステル、熱化学ルミネッセンス標識、アクリジニウムなどが挙げられる。これらの標識は例えば抗-ITA抗体に、当業者に良く知られた技術を用いてタンパク結合される。(米国特許第5,284,952号明細書を参照。この開示は参考文献によりこの全文中で組み込まれている)。1態様において、B207のような検出抗体は、米国特許第5,284,952,5,110,932号明細書及び第5,338,847号明細書に記載された手法を使用することによりアクリジニウムエステルで標識してもよい。この開示は参考文献によりこの全文中で組み込まれている。

#### 【 0 0 1 4 】

標識に用いられる蛍光材料の例には、フルオレセインや、フルオレサミン、フルオレッセイン、イソチオシアネート、アンベリフェロン(umbelliferone)、ローダミン、テキサ

10

20

30

40

50

ス赤塗料、フタロシアニン、クマリン、スクワライン (squaraine)、アントラセン、エリトロシン、ユーロピウムキレートなどが挙げられる。

標識に用いられる放射性同位体の例としては $^{14}\text{C}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{18}\text{F}$ 、及び $^{125}\text{I}$ が挙げられる。

開発され、本発明のアッセイに使用できる例示的な酵素は、米国特許第3,654,090号明細書、同3,791,932号明細書、同3,839,153号明細書、同3,850,752号明細書、同3,817,837号明細書、同3,879,262号明細書、Journal of Immunological Methods1:247(1972)、及び the Journal of Immunology109:129(1972)に記載されており、これらの開示はここで参考として全体として組み込まれている。酵素の他の例には、アルカリホスファターゼや、ガラクトシダーゼ、セイヨウワサビペルオキシターゼ、グルコニダーゼ、ホスファターゼ、ペプチダーゼ、アルカリホスファターゼなどが挙げられるが、これに限定されるものではない。本発明において有用な補酵素には検出可能な生成物、例えば光、を生成する分子反応は酵素が反応試剤を触媒するのを促進する分子及びもしくはタンパクが含まれる。補酵素にはFAD、及びNADが挙げられるが、これに限定されるものでない。

着色粒子の例にはコロイド金や、青色ラテックスが含まれる。

#### 【0015】

他の標識は、分光光度活性な物質の非活性先駆物質（英国特許第1,392,403号明細書及び仏国特許第2,201,299号明細書。これらの特許は米国特許第3,880,934号明細書に対応する。）、及び電子スピン共鳴部分（米国特許第3,850,578号明細書）を含む。

ここで記載されているように、本発明の方法を実施するために用いられる前記アッセイの特定のパラメータは、前記方法を実施する前に決定される。例えば、溶液の成分、及びその濃度（例えば、キャプチャー抗体及び検出抗体の濃度）、前記アッセイの実験条件、例えばバッファー溶液や、pH、イオン強度、温度、インキュベーション時間、固相担体、（前記担体と種々の抗体との間の結合化学、及び前記検出抗体と前記標識との間の結合化学）は通常の実験を実施して本発明の方法を最適化することにより、好ましくは事前に決定される。

本発明は、一部において、ここで開示されているように、抗体の組み合わせに対するIT Aの女性のレベル又は濃度を測定することにより、増加した感度及び精度で妊娠を検出できるという発見に基づいている。ここで開示されている方法は妊婦がダウン症候群の胎児を妊娠しているかどうかを決定するにも有用かもしれない。

#### 【0016】

ここで開示されている妊娠検出方法は、女性の生体サンプルを、ITAと結合する抗体に、単独で又は他の抗原又は生体マーカー（妊娠マーカー）と組み合わせて接触させる工程及び測定された抗原（例えばITA）の量を、決定されている標準と比較して、女性が妊娠している可能性を反映する工程を含む。

高まった尿又は血清hCG濃度は、妊娠の普通のマーカーであり、妊娠の適正な閾値は約25mIU/mL～約100mIU/mL（IUは国際単位を意味する。25mIU/mLはhCGの約1.79ng/mLに対応する。）の範囲である。従って、hCG濃度は、試験される女性が妊娠していることの表示である。ITA濃度はhCG濃度の増加のより先に増加することが信じられている。従って、生体サンプル内のITA濃度の測定することにより、hCG濃度が増加する前に妊娠を検出するマーカーが得られる。

本発明の方法の実施に有用な生体サンプルは、全血、血清、尿、血漿、及び羊水が挙げられるがこれに限定されるものではない。加えて、前記サンプルは、組織サンプル、例えば、妊婦の胎盤、膣及び子宮の組織をも含む。本発明の1つの態様において生体サンプルは尿である。サンプルは当業者に公知のいかなる通常の方法により妊婦から得られる。例えば、血清サンプルは通常静脈注射技術を用いて妊婦の一定量の血液を取り出すことにより得られる。羊水サンプルは注射針と注射器を用いて妊婦から羊水を取り出すことにより得ることができる。尿サンプルは妊婦から得ることができる。

#### 【0017】

ITAに対し生体サンプルをスクリーニングすることは、前記サンプルを特異的にITAに結

10

20

30

40

50

合する抗体と接触させることにより行うことができる。

1つの態様において、“サンドイッチ”型免疫反応アッセイを使用して、サンプル中のITAを測定する。本発明の方法は特異的にITAに結合するキャプチャー抗体を利用してもよい。前記キャプチャー抗体は固相基体又は液相に連結してもよい。適当な基体にはマイクロタイタープレートのウェルや、キュベット、ニトロセルロース、ナイロン膜が挙げられるが、これに限定されるものではない。本発明の1つの態様において、キャプチャー抗体がマイクロタイタープレートのウェル、又はキュベットの中で常磁性粒子に連結している。例えば、ビオチン連結キャプチャー抗体は周知のアビジン-ビオチン結合反応を介して、ストレプトアビジン、コーティング、常磁性粒子と連結できる。前記キャプチャー抗体を前記アッセイの固相に連結する他の方法は当業者に公知である。本発明の1つの態様において、前記キャプチャー抗体はB152と命名されている。B152モノクローナル抗体は以下に記載されているように特異的にITAと結合する。W098/10282, Prenatal Screening for Down's Syndrome Using Hyperglycosylated Gonadotropin; W099/41584hCG, Methods for Predicting Pregnancy Outcome in Subject by hCG Assay; W000/70094, Methods for Predicting Pregnancy Outcome in a Subject by hCG Assay; O'Connor et al., (1998) Differential Urinary Gonadotrophin Profiles in Early Pregnancy and Early Pregnancy Loss, Prenatal Diagnosis, 18:1232-1240; Cole et al., (1999) Hyperglycosylated Human Chorionic Gonadotropin (Invasive Trophoblast Antigen) Immunoassay: A New Basis for Gestational Down Syndrome Screening, Clinical Chemistry, 45:2109-2119; Cole et al., (1999) Urinary Screening Tests for Fetal Down Syndrome: II. Hyperglycosylated hCG: a Potential Screening Test for Fetal Down Syndrome, Prenatal Diagnosis, 19:488-490.

【0018】

前記サンドイッチ免疫アッセイの実施において、ITAは、検出可能な標識に連結した検出抗体に対し暴露してもよい。適切な標識の例は上述の通りであり、標識の1例はアクリジニウムエステルである。抗体に標識を連結する方法は当業者に周知である。例えば“スルホニルクロリドエステル”としてのアクリジニウムは、抗体のようなタンパク中のリジンのアミノ基のリシン(lysly)部分とアクリジニウムエステルとの反応により、前記検出抗体と架橋しうる。反応生成物は、次いでセファロースピーズでの粒径排除クロマトグラフィー(size exclusion chromatography)により分離される。1つの検出抗体はB207と命名された。B207はクリシェブスキー(Krichevsky)ら(1994)の、The development of a Panel of Monoclonal Antibodies to Human Luteinizing Hormone and its Application to Immunological Mapping and Two-Site Assays, Endocrine, 2:511-520。本発明の特定の態様において、前記サンドイッチ免疫アッセイは化学ルミネッセンス免疫アッセイである。ここで開示されている前記アッセイのITA濃度の感度の範囲は約1-300ng/mLである。しかし約0.1ng/mLの感度も含んでいる。本発明の方法に用いた前記抗体のhCG、 $\alpha$ -hCG、ニックhCG抗体との交叉反応は約4.5%未満であってよい。

【0019】

特定のモノクローナル抗体がここで開示されているが、ここで記載されているようなITAに対するキャプチャー抗体及び検出抗体として用いられている他のモノクローナル抗体は当業者に知られる通常の方法により生成することができる。例えば以下を参照せよ。Kohler and Milstein, (1975) Nature, 256:495-97; or Sambrook et al. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3<sup>rd</sup> edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press。要するにマウスのような動物を担体タンパクと連結してもよいITAなどの抗原、又はそのフラグメントで注射する。前記動物は1種以上の抗原注射により追加免疫され、融合前約3日間静脈(IV)ブースターにより超免疫化(hyperimmunized)される。マウス由来の脾臓細胞を単離し、標準的方法により骨髓腫細胞と融合する。標準的方法によればハイブリドーマは、標準的ヒポキサンチン/アミノプテリン/チミン(HAT)培地にて選択される。前記抗原の異なるエピトープを認識する抗体を分泌するハイブリドーマを、通常の免疫学的技術を用いて同定し、培養され、サブクローニングする。次に前記抗体は当業者に知られた方法を用いて所望の特異性、又は交叉反応のスクリーニングをされる。



## 【0020】

本発明の1つの態様は本発明の方法を実施するために化学ルミネッセンスアッセイのサンドイッチ免疫アッセイを使用するが、ELISA及びRIAのような他の免疫アッセイも用いられる。前記アッセイがアッセイされる生体サンプル中のITA濃度の大きさを与えることが当業者に周知のように、前記アッセイのパラメータ及び構成が、決定され、最適化される。加えて、本発明のある態様はITAを捕捉する薬剤として抗体を利用するが、ITAは抗体でない他の化学試薬又は分子を用いて本発明のアッセイにおいても捕捉できる。例えばそのような薬剤はITAの炭水化物特性を認識し、それによって、ここで記載されているキャプチャー抗体と同様にして固相にITAを結合させることができる。

本発明のいくつかの態様において、結果の反復可能性を改良し、かつ前記アッセイの実施に要する時間とコストを削減するために、できるだけ実用的となるように本発明の方法を自動化することは望ましい。本発明の方法を実施するために用いた自動化されたアッセイにより、ユーザーは少なくとも1時間あたり約80回の試験、好ましくは1時間あたり約100回以上の試験を行うことができる。

## 【0021】

本発明の方法を実施するために、通常の自動化されていない、アッセイ装置も用いる者もいるかもしれない。例えば、通常のマイクロタイタープレートは前記アッセイを実施する際に用いる種々の溶液の保管に用いることができる。前記装置により前記生体サンプルを抗体の組合せに暴露されることになる。前記抗体はアッセイされる抗原の異なるエピトープを認識できる。アッセイ中において溶液を加え、及び除去する際、本装置はまた結合した抗原を基体に保持させる。

ここで記載のように、非制限的な例として、マイクロタイタープレートのウェルにはストレプトアビジンでコートした磁性粒子を含む溶液を装入できる。ビオチン結合したキャプチャー抗体（例えば連結ビオチンB152mAb）を含む溶液を、キャプチャー抗体と磁性粒子の連結を可能にするため、ウェルに加えられる。ここで記載されているように、キャプチャー抗体の濃度は、サンプル中で利用可能な試験抗原のすべて、実質的に全てと結合できるように経験的に選択される（予測される抗原濃度に基づいて）。その点において、生体サンプル中の典型的な抗原濃度はナノグラムから低マイクログラム範囲にあり（例えば1ng/ml-5µg/ml）、これによってキャプチャー抗体濃度はマイクログラム範囲の低から高までである（例えば1-100µg/ml）。前記サンプルはウェルに加える。前記サンプルが、関心のある抗原（例えばITA）を含有する場合、前記抗原は前記キャプチャー抗体と結合する。前記プレートは磁性粒子に固定するために磁場にさらされ、前記溶液はウェルから除かれる。しかし前記抗原は除かれない。磁場により固定された磁性粒子に結合している抗体に、抗原は結合しているためである。標識（例えばアクリジニウムで標識したB207mAb）に連結された検出抗体を含む溶液は、結合した抗原を含むウェルに添加される。別途指摘されているように、検出抗体の濃度は好ましくは試験抗原分子（例えばITA）の全て、実質的に全てが前記検出抗体と結合するように選択される。かくして、前記検出抗体は少なくとも試験抗原の予測濃度より1オーダー大きい濃度で提供することができる。例えば、試験抗原が100ng/mlの予測濃度を有する場合、前記検出抗体濃度は1000ng/ml（1µg/ml）となり得る。ここで記載されているように経験的に決定、最適化された十分な時間（約10分から約8又はそれ以上の時間）の後、前記プレートは磁場にさらされ、その後溶液は除かれ、サンプルは洗浄される。ウェルに残っている標識の量が、次いで測定される（例えば、分光計により）。測定値は定量的又は定性的であり得る。定量的な結果は通常好ましい。前記測定値は、次いで、基準又は閾値と比較される。

## 【0022】

ニコルズアドバンテージ(The Nichols Advantage)（登録商標）免疫アッセイ系は、本発明の方法を実施するために用いられ得る十分に自動化された化学ルミネッセンス系である。前記系は固相化学ルミネッセンス免疫アッセイを行うためのベンチトップ機器である。ステプトアビジンでコートした磁性粒子及びビオチン標識された抗体は前記アッセイ系にて使用できる。アクリジニウムエステルは典型的にシグナル検出のための化学ルミネ

10

20

30

40

50

センス標識である。前記アドバンテージ免疫学的アッセイ系は異なる形式を使える柔軟性を有し、各個々のアッセイに対するインキュベーション時間を最適化する。前記系は3つの異なるアッセイ形式を支持する。1) 抗体及び固相が同時に、前記サンプルとインキュベートされる同時アッセイ形式、2) 抗体を、前記サンプルとともにインキュベートし、ストレプトアビジンでコートした磁性粒子を添加し、次いでさらにインキュベーション段階を有する連続的アッセイ形式、3) 1つの抗体及び固相を抗原に結合した次いで洗浄し、及び標識された抗体の添加後インキュベーションすることを含む2段階アッセイ形式。前記系の他の特徴は、オンボード冷凍、プライマリーチューブサンプリング、自動凝固、及びパブル検出、要時使用の試薬カートリッジを含む。

#### 【0023】

本発明の方法の実施において、反応が成功したことを確実にするためにアッセイにおいてコントロールが与えられる。例えばコントロールとしては生体サンプル中に存在する他の被検体に対する、ポリクロナール抗体溶液が与えられ得る。特定の例はサンプル中のプロゲステロン、又はそれらの代謝物の存在を検出することである。本方法が実施され、サンプル及びコントロールに対する結果が陰性である場合、又はサンプルが陽性であり、コントロールが陰性である(例えば検出可能なシグナルがない)場合は、女性はまず妊娠していないか、試験プロトコルエラーか、試験材料がいくつかの方法において損なわれていることを意味する可能性が高い。それとは別に、シグナルがサンプル反応域及びコントロールにおいて検出された場合、女性は妊娠している可能性が高い。

以下の実施例は妊娠を検出するために用いられるアッセイ及び方法を説明するために示されている。方法と結果はスクリーニングされた抗原だけでなく、用いられているアッセイのパラメータに依存して変わり得る。これらの実施例は決して本発明の範囲を限定することを意図するものでない。

#### 【実施例1】

#### 【0024】

##### ITA化学ルミネッセンスアッセイ

以下で示された方法はニコルスアドバンテージ(a Nichols Advantage) (登録商標) アッセイ系(カリフォルニア州サン・ファン・カプストラノ(San Juan Capistrano, CA)所在のニコルス・インスチテュート・ダイアグノスチックス(NID))において実施した。

ここで記載されているように一連の溶液が提供され、個々のバイアル又は容器に保管されている。アッセイバッファー溶液は0.5Mリン酸塩バッファー生理食塩水(PBS; pH7.6)中の、4%のプロテアーゼフリーのウシ血清アルブミン(BSA)を含有する。キャプチャー抗体溶液は、pH7.4において、4.2 µg/mL(即ち、0.42 µg/test)のビオチン連結キャプチャー抗体(B152)、0.5MPBS中の0.5%プロテアーゼフリーのBSA、6%正常マウス血清、及び0.1%マウスグロブリンを含有する。磁性粒子の溶液は、正常マウス血清中、4mg/mLのストレプトアビジンでコートされた磁性粒子(M270; Dynal Biotech, Inc., Lake Success, NY)を含有する。検出抗体溶液は、pH6.0において、0.1MPBS中約0.1 µg/testのアクリジニウムエステルで標識された検出抗体(B207)、及び0.4%BSAを含有する。洗浄溶液は、PBS中にTween(登録商標)などの界面活性剤を、防腐剤として0.1%アジ化ナトリウムとともに含有する。

前記アッセイは、15 µLのサンプル又は基準物質(ITA基準物質など)、260 µLのアッセイバッファー、70 µLのキャプチャー抗体溶液、及び25 µLの磁性粒子溶液をプレートのウェル又はキュベットに添加することにより実施した。この溶液を30分間37 °Cにおいてインキュベートした。

#### 【0025】

インキュベーション後、前記プレートは、磁場にさらし、ITA/キャプチャー抗体/磁性粒子複合体を固定した。上清を除去し、ウェルを洗浄液で洗浄した。実験的に決定し、最適化された十分な洗浄の後、前記プレートは前記磁場から除去し、ウェルに50 µLの検出抗体溶液及び250 µL正常マウス血清を添加した。前記溶液を約10分間37 °Cにおいてインキュベートした。その後、前記プレートを再度磁場にさらし、検出抗体/ITA/キャプチャー抗体/磁性粒子複合体を固定した。上清を除去し、ウェルを洗浄した。HClのような希酸中

10

20

30

40

50

に過酸化水素を含有する酸性溶液、及び希水酸化ナトリウムを含有する塩基溶液を、次いでアクリジニウムエステルのシグナルを引き起こすために、ウェルに、添加した。その後、検出されたシグナルの量を分光計により測定し、データを記録した。

前記検出シグナルが前記アッセイの感度範囲を超えた場合、pH7.4において0.5MPBSの0.1%プロテアーゼフリーのBSAを含有する希釈剤により前記サンプルを希釈した。

前記アッセイは6種のITA標準物質を用いてキャリブレーションをとった。前記ITA標準物質の濃度は、約1.3ng/mL、約2.5ng/mL、約8.2ng/mL、約22.8ng/mL、約91.7ng/mL、約271ng/mLである。それぞれの標準物質に対する算出された相対的な光単位(RLU)はそれぞれ914RLU、1,630RLU、4,873RLU、12,794RLU、48,149RLU、135,384RLUであった。基準線RLU(即ち、ITA濃度が0ng/mLの時)は314RLUである。このアッセイ結果は黒抜きダイヤ( )により示した図1A及び図1Bにおいて表されている。

上述のように、女性の尿サンプルをITAに対しスクリーニングした。尿サンプルは1,095RLUの検出可能なシグナルを示した。ITA標準物質のデータに基づき、これは1.6ng/mLのITA濃度に相関していた。

#### 【実施例2】

##### 【0026】

##### ITA/無処置のhCGアッセイ

コンビネーションアッセイ(“コンボ(combo)”アッセイ)を、実施例1に記載されたB152-B207アッセイを用いて、再び実施した。但し、B152キャプチャー抗体及びITAによる最初のインキュベーションの間、無処置のhCGに特異的に結合する追加のキャプチャー抗体をウェルに添加した。用いた抗体はクローン820と命名された(Biodesign International, (Saco, Maine)より購入。Cat.No.E45550M)。このアッセイはここで、“コンボ820/B152-B207”という。特に、このコンボアッセイにおいて、前記キャプチャー抗体はクローン820及びB152モノクロナール抗体であり、検出抗体はB207モノクロナール抗体である。このアッセイ結果は黒抜き三角( )により示した図1A及び図1Bにおいて説明されている。

予想外にも、ITAの検出シグナルはB152-B207を単独で用いた検出シグナルより実質的に大きいことが明らかとなった。その点、6種のITA標準物質は、1,850RLU(1.3ng/mL)、3,178RLU(2.4ng/mL)、10,940RLU(8.4ng/mL)、31,119RLU(23.1ng/mL)、123,118RLU(90.0ng/mL)、及び341,532RLU(271.8ng/mL)のシグナルを示した。

これらの結果は、コンボアッセイ820/B152-B207がB152-B207アッセイ単独よりも約2-3倍大きい感度を示すことを示唆しているように見える。従って、現在利用されているアッセイよりも、より早い時点で、生体サンプル中のより小さいITA濃度を検出できる可能性がある。

精製されたモノクロナール抗体クローン820を単独で利用するアッセイは結果的にコンボアッセイ820/B152-B207又はB152-B207アッセイより大きな検出シグナルを発するように見えたことも注目に値する。前記結果はアスタリスク(\*)により示した図1A及び図1Bにおいて表されている。

#### 【実施例3】

##### 【0027】

##### ITA/遊離した hCGアッセイ

コンビネーションアッセイ(“コンボ”アッセイ)を、また実施例1に記載されているB152-B207アッセイを用いて実施した。但し、遊離した hCGに対する追加のキャプチャー抗体を、B152キャプチャー抗体及びITAによる最初のインキュベーションの間、ウェルに添加した。使用した抗体はクローン#827と命名した(Biodesign International, (Saco, Maine)より購入。Cat.No.E45575M)。このアッセイはここで、“コンボ827/B152-B207”と呼ぶ。特にこのコンボアッセイにおいて、前記キャプチャー抗体はクローン827及びB152モノクロナール抗体であり、検出抗体はB207モノクロナール抗体である。このアッセイの結果は黒抜き四角( )により示した図1A及び図1Bにおいて説明されている。

更に予期外なことには、ITAの検出シグナルは単独のB152-B207アッセイ又はコンボ820/B152-B207アッセイを用いた検出シグナルより実質上大きいと思われる。この点、6種のI

TA標準物質は次のシグナル、8,033RLU(1.3ng/mL ITA); 16,957RLU(2.5ng/mL ITA); 55,264RLU(8.2ng/mL ITA); 142,512RLU(22.9ng/mL ITA); 441,900RLU(92.2ng/mL ITA); 842,974RLU(267.9ng/mL ITA)を示した。

これらの結果はコンボアッセイ827/B152-B207はB152-B207アッセイ単独に比べ約6~12倍大きい感度を示すように思われることを示唆する。従って、現在利用可能なアッセイにより得られるより、初期時点における生体サンプルのITAのより小さい濃度の検出が可能であろう。

また、精製されたクローン827を単独で利用するアッセイはコンボアッセイ827/B152-B207又はB152-B207アッセイより、結果的により大きく検出可能なシグナルとなるらしいことも注目に値する。前記結果はX(X)により示した図1A及び図1Bにおいて示されている。前記827-B207アッセイは前記B152-B207アッセイよりおよそ8~22倍高感度と思われる。

【実施例4】

【0028】

排卵5日後の前記女性は性交後妊娠したか否か知ることを望んでいた。彼女は尿を産婦人科医に預けた。前記サンプルは実施例1-3に記載されたアッセイのいずれかを用いてITAに対しアッセイした。前記サンプルにおいて測定されたITA濃度は約1.0ng/mLであった。産婦人科医は前記女性が妊娠していることを確認した。

【実施例5】

【0029】

不妊治療を受けている前記女性は結果的にin vitro受精した少なくとも1つの胎芽を移植される。移植後約3-4日後、移植が成功したか否かを決定するために前記女性は彼女の医師に尿サンプルを預けた。前記サンプルをITAについてスクリーニングした。前記サンプル中のITA濃度は約0.3ng/mLであった。前記医師は前記女性が妊娠していることを確認した。

【実施例6】

【0030】

排卵後の7日後の前記女性は、性交後妊娠しているか否か知ることを望んでいた。彼女は実施例1-3に記載されているいずれか1つのアッセイを利用した“家庭用妊娠キット”を入手した。前記キットはサンプルカップ、ピペット、及びアッセイ装置が含まれていた。前記アッセイ装置は、サンプル用のウェル、キャプチャー抗体溶液の保管用容器、検出抗体溶液の保存用容器、コントロール溶液保存用容器、アッセイの操作を制御するための電子部品、及び写真フィルムや光真空管のようなシグナル検出器を含んでいた。前記シグナル検出器はアッセイにより生成されたシグナルを検出し、好ましくは約0.18ng/mLより大きいITA濃度に対応するシグナルを検出するように設定されていた。前記サンプルをピペットで取って前記キットのサンプルウェルに入れた。前記アッセイを前記サンプルについて実施した。前記サンプルに対する光真空管は光を放射しないがコントロール溶液に対する光真空管は光を放射する。これによって、前記アッセイが成功したが、彼女が妊娠していないことを確認した。

種々の刊行物、及び/又は参考文献をここで引用したが、これらの内容はここで参考として取り込まれている。

本発明について種々の特定の実施例や態様に関連して記載したが、本発明がそれらに限定されることなく、また別紙の特許請求の範囲内において種々に実施できることは理解される。

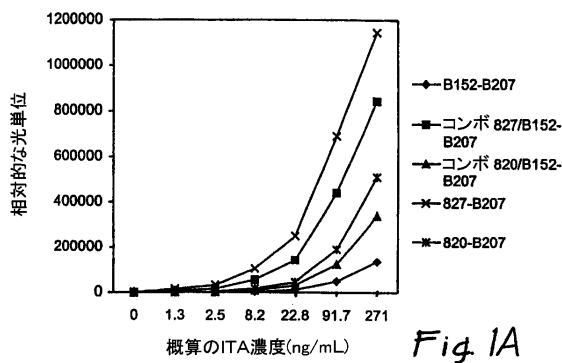
【図面の簡単な説明】

【0031】

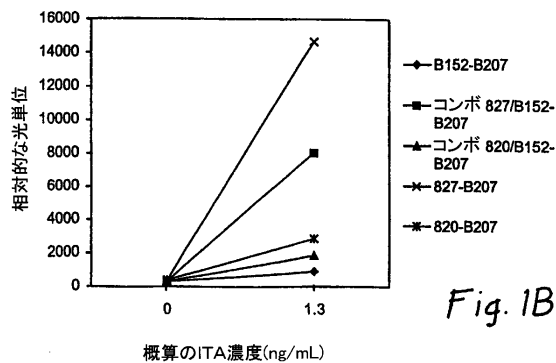
【図1A - 1B】概算のITA濃度(ng/mL)に対する相対的な光単位のグラフを示す。図1Bは図1Aの拡大版である。ITA濃度が約0ng/mLと約1.3ng/mLにおけるデータを示す。このデータは実施例1-3に記載されている5つのアッセイから成る。記号は特定のキャプチャー抗体-検出抗体の組み合わせを表す。黒抜きダイヤ( )はB152-B207アッセイを表す。黒抜き四角( )はクローン827/B152-B207のコンビネーションアッセイを表す。特にモ

ノクロナール抗体、クローン827、及びB152はキャプチャー抗体であり、モノクロナール抗体B207は検出抗体である。黒抜き三角( )はクローン820/B152-B207のコンビネーションアッセイを表す。X(X)はクローン827-B207アッセイを示す。特にモノクロナール抗体、クローン827はキャプチャー抗体であり、モノクロナール抗体、B207は検出抗体である。アステリスク(\*)はクローン820-B207アッセイを示す。

【 図 1 A 】



【 図 1 B 】



---

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

G 0 1 N 33/543 5 7 5

(74)代理人 100114007

弁理士 平山 孝二

(72)発明者 パンディアン マルガン アール

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 6 9 1 ミッション ヴィージョ アルメンドラ 2 7  
4 3 2

(72)発明者 リュ ジュリー ワイ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 6 9 2 ミッション ヴィージョ バスカドアー 2 6  
2 5 5

審査官 海野 佳子

(56)参考文献 国際公開第99/041584(WO, A1)

特表2001-506744(JP, A)

特開2000-111552(JP, A)

特表平02-500949(JP, A)

特開昭62-276461(JP, A)

特開昭63-096557(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48-98